

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平4-70558

⑮ Int. Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成4年(1992)3月5日

G 01 N 27/327

7235-2J
7235-2J

G 01 N 27/30

3 5 3 R
3 5 3 J

審査請求 有 請求項の数 4 (全6頁)

⑭ 発明の名称 エタノールセンサー

⑯ 特 願 平2-181583

⑰ 出 願 平2(1990)7月11日

⑱ 発 明 者 椎 木 幹 夫 山口県山口市罌石町4-23
⑲ 発 明 者 南 波 章 広島県庄原市東本町1-20-18
⑳ 出 願 人 山 口 県 山口県山口市滝町1番1号
㉑ 代 理 人 弁理士 村田 幸雄

明 細 書

1. 発明の名称

エタノールセンサー

2. 特許請求の範囲

(1) 水溶性フェリシアン酸塩と陽イオン界面活性剤、両性界面活性剤又は非イオン界面活性剤から合成される疎水性化合物を電子受容体として、酢酸菌膜結合性アルコール脱水素酵素とともに電極剤として混在せしめた酵素及び電極受容体修飾電極と、参照電極とを組み合わせることを特徴とするエタノールセンサー。

(2) 電極剤が、導電性材料粉末を混合してなるものであることを特徴とする請求項1記載のエタノールセンサー。

(3) 水溶性フェリシアン酸塩が、フェリシアン化カリウムであることを特徴とする請求項1又は2記載のエタノールセンサー。

(4) 電極剤が、酵素と電子受容体と有機結合剤と

の混合物からなるものであることを特徴とする請求項1ないし3のいずれかに記載のエタノールセンサー。

3. 発明の詳細な説明

【産業上の利用分野】

本発明は、液体試料中のエタノール濃度を測定するエタノールセンサーに関する。

【従来の技術】

溶液中のエタノールを測定するセンサーとしては、ガス透過性チューブにキャリアガスを流し、チューブ内に透過したエタノールをガスクロマトグラフ、赤外線ガス検出器などで検知する装置が知られている。このものはオンライン計測が可能であるが、装置が大型で複雑であるためエタノール測定を簡便に行えないという欠点を有していた。

これに対して、小型のアルコールセンサーとしては、アルコールに作用する種々の酵素を利用したものが開発されている。これらは、構成が簡単であり比較的容易に作成できることから実用に供

されている。

これらのうち、アルコールオキシダーゼを使用したものは、この酵素の基質特異性が低く、メタノールにもエタノールと同様に反応するという欠点を有している。

また、ニコチンアミドアデニンヌクレオチド(NAD)依存のアルコール脱水素酵素を用いるセンサーは、メタノールに反応しないという点で特異性には優れているが、高価なNADを使用しなければならず、またNADHからNADへの再生も困難であるため実用的でなかった。

これらの欠点を克服するために、酢酸菌に存在する細胞膜結合性アルコール脱水素酵素(ADH)を利用したセンサーが開発されている。この酵素は補酵素ピロロキノリンキノン(PQQ)関与で、エタノールに選択的に反応する。PQQはADHと強く結合しているため特別に固定化する必要がなく、NADを使用する必要もないという優れた特徴を有している。

従来、酢酸菌に存在する膜結合型ADHを利用

ローセル方式の測定法では液量が多くなる。その場合、電子受容体を測定液や電解液に溶解して利用することは作業性が悪く、フェリシアン化カリウムを使用する場合は特にシアンイオンの廃液処理の問題が生じる。また、PMSを使用する場合は、特にランニングコストが高くなる。

また、測定時間としては、④は数分、⑤は1～2分を必要としており、多くの試料を測定する場合にはさらに短時間で測定可能であることが望ましい。

【課題を解決するための手段】

本発明者らは上記の点に鑑みて鋭意研究の結果、電子受容体を電解液中から排除し、また、短時間で測定が可能なエタノールセンサーを開発した。

すなわち本発明は、水溶性フェリシアン酸塩と陽イオン界面活性剤、両性界面活性剤又は非イオン界面活性剤から合成される疎水性化合物を電子受容体として、酢酸菌膜結合性アルコール脱水素酵素とともに電極剤として混在せしめた酵素及び電極受容体修飾電極と参照電極とを組み合わせ

したセンサーに関する公開特許としては、①特開昭61-265560号、②特開昭61-281961号、③特開昭62-277548号、④特開平1-96552号、⑤特開平1-97851号がある。

これらのうち①、②、③は測定系に電子受容体を使用していない、従って、エタノールが酵素により酸化されると同時に還元型へ変化したPQQを酸化型へ戻す系が弱いため応答に時間がかかる。

④、⑤は測定液中に酸化型の電子受容体を溶解している。従って、測定時には電子受容体が酵素反応と共役し、PQQを酸化型へ復帰させ、自身は還元される。さらに、これを電極で酸化する方法をとっているため短時間で測定が可能である。
【発明が解決しようとする課題】

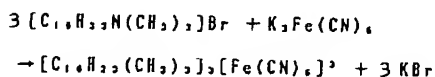
上記④、⑤においては、電子受容体としてフェリシアン化カリウムやフェナジンメトサルフェート(PMS)等を測定液もしくは電解液に溶解して使用している。この測定液は、センサーを長時間使用した場合にはかなりの量に達する。特に、フ

なるエタノールセンサーである。

上記に本発明において、水溶性フェリシアン酸塩としては、フェリシアン化カリウム、フェリシアン化ナトリウム、その他水溶性のフェリシアン化合物が挙げられる。

また、陽イオン界面活性剤としては長鎖第4級アンモニウム塩、長鎖アルキルピリジニウム塩等が、両性界面活性剤としては例えばアルキルジアミノエチルグリシン形のものが、そして非イオン界面活性剤としては例えばポリオキシエチレン系のものが挙げられる。

水溶性フェリシアン酸塩、例えばフェリシアン化カリウムとこれらの界面活性剤とは、水溶液中で反応を起こし黄色沈殿を生じる。この沈殿物質は本発明における電子受容体として用いられる。以下に反応式の一例を示す。



得られた化合物は疎水性であるので、濾過、水洗して簡単に精製することができる。

過去にこのような化合物を電子受容体としてセンサーに利用した例はない。

また、本発明において使用する細胞膜結合型ADHを産生する酢酸菌としては、アセトバクター属(*Acetobacter*)グルコノバクター属(*Gluconobacter*)に属するいずれの酢酸菌の菌体でもよい。

酵素はフレンチプレス法や超音波法等の常法により細胞膜面分を分離し、さらに界面活性剤で細胞膜面分から抽出し、種々のクロマトグラフィーにより精製分離して得ることができる。また、精製分離を行わなくとも酢酸菌の菌体そのままあるいは細胞膜面分といった粗製品でも酵素源として利用できる。

なお、本発明の場合も常法と同様に、電極剤にはグラファイト等の導電性材料粉末を混合して、エタノールセンサー表面から得られる電流を容易に電極へ導くようにすることが好ましい。

さらに、本発明のエタノールセンサーの電極剤

には、有機結合剤、例えば流動パラフィンを混合することが好ましい。その理由は、酵素と電子受容体が、測定時にエタノール含有試料液と接触して、流出、崩壊するのを防止するため、また電極表面への接着による上記電極剤修飾を確実化するためである。

修飾電極を製作するには、まず上記のようにして得られたADH含有物と電子受容体とを導電性材料粉末(例えばグラファイト粉末)と有機結合剤(例えば流動パラフィン)とよく混合してペースト状に練り上げる。次に、第1図に示すごとく、該ペーストをグラファイト固結物13の端面に塗布し、硬化させて電極剤10とすることにより、膜結合性ADHと電子受容体とを電極剤に含む酵素及び電子受容体修飾電極1が製作できる。

修飾電極1の構成は、フランジ付きテフロン製筒体15とそれに頭部が突出して挿入されている銅製ネジ付きボルト12とその前方部に着設されたグラファイト固結物13と、更にその前方端面に接合された前記電極剤10とからなる。なお、

銅製ネジ付きボルト12の中腹には取付用ナット14が螺合されている。

次に、第2図に示すごとく、上記修飾電極1を反応セル3に取り付ける。反応セル3内には、更に参照電極2を検知部が位置するように取り付け、また、反応セル3の中央には磁気攪拌子4を回転自由に枢支する。そして、上部には試料供給口33が、下方左端には電解液導入口31が、また上方右端には測定排液導出口32が設けられている。

試料中のエタノール濃度を測定するには、第3図に概要図を例示するエタノール濃度測定装置を使用する。

すなわち、該測定装置の、電解液槽6内の測定用電解液(例えばpH調整用バッファーと電解質(例えばKCI)を含む)をポンプ8で反応セル3中に注入し、測定装置の定電圧電源部より修飾電極1と参照電極2間に加電する。その結果、両電極間に発生する酸化電流を電流電圧変換回路を用いて、電流値を電圧値に変換した後増幅し、レコーダーでチャートに記録する。なお、増幅された電圧値

をA/D変換した後、コンピュータで処理することもできる。図中、7は測定済み廃液槽である。

電圧が安定した後、エタノールを含んだ試料水溶液の一定量をマイクロシリンジで前記反応セル3中に注入供給し、上記と同様にして酸化電流を電圧として測定し、電圧の増加量を求める。

この増加量とエタノール濃度が比例することからエタノール濃度が求められる。測定中において、スターラ5を起動して、反応セル3中の磁気攪拌子4を回転させておけば、試料と電解液との混合が均一に行えるので、バラツキのない正確な測定値が得られる。

ところで、電解液は酵素反応を円滑に進めるためにpHを4から7の間に調整することが望ましく、また例えばKCI等の強電解質を含んでいる必要がある。さらに、電解液を反応セルの導入口31に一定流速で注入し、またその導出口32から排出させながら測定するフローインジェクション法によっても測定が可能である。

以上、述べてきたエタノールセンサーによれば、

酢酸菌の細胞膜結合性ADHによるエタノールの酸化反応及びPQQ、電子受容体を介した電子伝達系によって生じる酸化電流を直接アンペロメトリックに測定することができるため、応答時間が速く直線性に優れている。

さらに、本発明に係る電子受容体は水溶液中で簡単に合成、単離することができる。また、この電子受容体及び酵素はいずれも疎水性であるので、特別な処理を行わなくとも有機結合剤と混合するだけで電極剤として固定化され、測定用電解液中に溶出することもないため、酵素固定膜を有する他のバイオセンサー等に比較して、電極の作成が容易である。そして、本発明に係る電子受容体をも修飾しており、新規なものである。

本発明のエタノールセンサーを使用して測定する場合には、測定用電解液中にフェリシアン化カリウム等の電子受容体を溶解する必要がないため、作業性が良くなり、シアン等の廃水処理をする必要がない。

なお、種々の大きさの反応セルを使用したり、

(3) 酵素及び電子受容体修飾電極の製作

上記(1)で得られたADH含有膜面分(A)、上記(2)で得られた電子受容体(B)、グラファイト粉末(C)及び流動パラフィン(D)を、A:B:C:D=10:1:12:10の比率(重量比)で混合し、ペースト状に練り上げたものを第1図図示のごとく、電極のグラファイト固結物13の先端部分に少量塗り込んで固結させた後、その表面を硫酸紙でこすって平滑にし、酵素及び電子受容体保有する修飾電極1を製作した。

(4) エタノール濃度の測定

(a) エタノール濃度検量線図の作成:

上記(3)で製作された修飾電極1を、第3図に図示のごとく、反応セル3に取り付け、0.1Mリン酸バッファー(pH6.0)に0.1M塩化カリウム、20mM塩化マグネシウムを含有した電解液をポンプ8で反応セル3中に導入口31から注入し、スターラー5を起動して磁気攪拌子4を回転させて攪拌した。

次いで定電圧電源部より修飾電極1と参照電極

フローインジェクション方式を採ることにより定量範囲を広くすることも可能である。

【実施例】

次に本発明を実施例により具体的に説明する。

(1) 細胞膜結合型ADHの調製

培養した *Glucanobacter soboxydans* (IFO 12528) の菌体を遠心分離して集菌し、得られた菌体をフレンチプレスにより破砕した。この破砕物を超遠心分離(100,000×g, 60分)して得られた沈でん(膜面分)をそのまま膜結合性ADHとして用いた。

(2) 電子受容体の合成

陽イオン界面活性剤の1種である臭化 n-ヘキサデシルトリメチルアンモニウム0.1M水溶液に、0.05Mフェリシアン化カリウム水溶液を同量添加する。すると瞬時に反応が起こり、黄緑色の疎水性化合物が懸濁生成された。

この化合物をろ紙でろ過し、充分水洗した後、減圧乾燥し、電子受容体として使用した。この物質は水に不溶であり有機液相にわずかに溶解した。

(塩化銀電極)2に+0.6V加電し、両電極1、2間に発生する電流を電圧電流変換回路により電圧に変換した後、これを増幅し、レコーダーでチャートに記録した。

電圧が安定したところで電圧値V₀を測定し、次に既知の濃度のエタノール試料水溶液5μlを反応セル3内にマイクロシリンジで注入した。エタノール試料水溶液の添加とともに直ちに電圧が変化し30~60秒で出力が安定するので、この時の電圧値V₁を測定しV₀とV₁との差ΔVを算出した。

さらに、反応セル3にポンプ8で電解液をセル容量の5倍量程度注入しセル3内を洗浄した後、再びV₀を測定した。電解液で洗浄した場合のベースライン復帰も30~60秒であった。このようにセルの洗浄、電圧測定、試料の注入、電圧測定を繰り返し、種々の濃度のエタノールに対するΔVを測定し、第4図に示す検量線を作成した。

(b) 試料のエタノール濃度測定:

アルコール発酵の発酵液やビールについて、(a)と全く同じ方法で ΔV を測定し、先に作成した検量線と比較してエタノール濃度を算出した。

この値は、ガスクロマトグラフで測定した値とよく一致していた。

【発明の効果】

以上のとおり、本発明のエタノールセンサーによれば、酢酸菌の細胞膜結合性ADHによるエタノールの酸化反応及びPQQ、電子受容体を介した電子伝達系によって生じる酸化電流を直接アンペロメトリックに測定することができるため、反応時間が速く直線性に優れている。

また、本発明に係る電子受容体は水溶液中で簡単に合成・単離することができ、そしてこの電子受容体及び酵素はいずれも疎水性であるので、特別な処理を行わなくとも有機結合剤と混合するだけで電極剤として固定化され、測定用電解液中に溶出することもない。このため、酵素固定膜を有する従来のエタノールセンサーに比較して、電極の作成が容易である。

33：試料供給口。

特許出願人 山口 県
代理人 井理士 村田 幸雄

さらに、本発明のエタノールセンサーを使用し測定する場合には、測定用電解液中にフェリシアン化カリウム等の電子受容体を溶解する必要がないため、作業性が良くなり、シアン等の廃水処理をする必要がない。

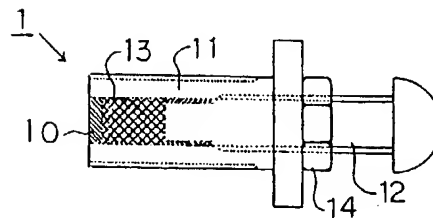
4. 図面の簡単な説明

第1図は本発明実施例の酵素及び電子受容体修飾電極の構造図、第2図は反応セルの構造図、第3図はエタノール濃度測定装置の概要図、第4図はエタノールセンサーを用いた検量線図をそれぞれ示す。

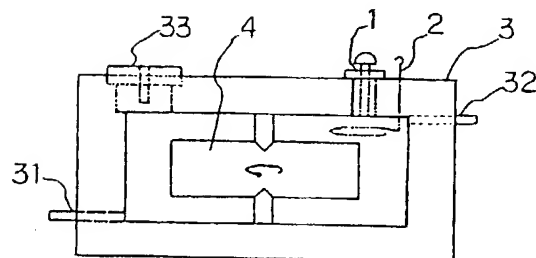
図中

- 1：修飾電極、2：参照電極、3：反応セル、
- 4：磁気攪拌子、5：スターラ、6：電解槽、
- 7：排液槽、8：ポンプ、10：電極剤、
- 11：フランジ付きテフロン製筒体、
- 12：銅製ネジ付きボルト、
- 13：グラファイト固結物、14：ナット、
- 31：電解液導入口、32：測定液排出口、

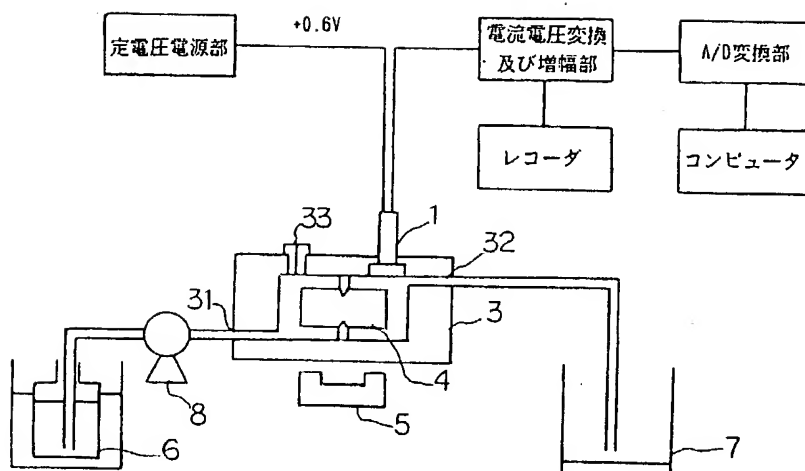
第1図



第2図



第 3 図



第 4 図

